

氏 名 みさわ ひろき
 三澤 広貴

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 235 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
 東西統合医学専攻

学位論文題目 Protection afforded by prostacyclin mimetics against
 LPS/D-GalN-induced acute liver injury in mice : role of
 their anti-oxidative stress function
 (LPS/D-GalN誘導性急性肝傷害マウスに対するプロスタサイクリン
 誘導体の抗酸化ストレス機能を介した保護作用)

論文審査委員

(主査)	教 授	杉山 敏郎
(副査)	教 授	井村 穰二
(副査)	教 授	稲寺 秀邦
(副査)	教 授	野口 誠
(指導教員)	教 授	嶋田 豊

論文内容の要旨

〔目的〕

急性肝不全は急性肝傷害が重症化し、急激に肝細胞が破壊され、生命が維持できないほど肝機能が低下する病態である。敗血症に伴う臓器障害のひとつとしても急性肝傷害が起こり、集中治療の目覚ましい進歩にもかかわらず救命率が 50%以下と低いのが現状である。プロスタグランジンは人間のさまざまな組織や器官でみとめられる生理活性物質である。そのうちのひとつ、プロスタサイクリンは主に血管内皮で産生され、血管拡張作用、血小板合成阻害作用があることが知られていたが、近年敗血症時の炎症性サイトカインの産生を抑制する効果や肝細胞増殖因子の発現を増加する効果が見出された。

本研究の目的は、ヒト急性肝傷害に類似し広く使用されている Lipopolysaccharide (LPS) /D-galactosamine (GalN) 誘導性急性肝傷害マウスモデルに対し、炎症性サイトカインの産生を抑制する効果のあるプロスタサイクリン製剤, ONO-1301 および Beraprost を使用した際の治療効果とその分子機構を明らかにし、敗血症およびそれに伴う急性肝傷害の新たな治療薬になり得るかを検討することである。

〔方法並びに成績〕

C57BL/6J 雌性マウス 8 週齢に対し Lipopolysaccharide (LPS) 10 μ g/kg + D-Galactosamine (D-GalN) 650 mg/kg を腹腔内投与し急性肝傷害を誘導した。急性肝傷害を誘導する 1 時間前にプロスタサイクリン製剤である ONO-1301 (10mg/kg) もしくは Beraprost (0.2mg/kg) を腹腔内注射した。モデル作成 6 時間後に心臓血および肝臓のサンプリングを行った。結果、LPS/GalN 投与群と比較しプロスタサイクリン製剤投与群では心臓血から得た血清 AST, 血清 ALT の上昇が有意に抑えられた。炎症性サイトカイン、ケモカインである *il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *mcp-1* の mRNA 量を定量的 PCR 法で解析したところ、プロスタサイクリン製剤投与群で *il-1 β* , *tnf- α* , *mcp-1* の発現量が有意に低下していた。肝の組織学的所見についても検討を行った。HE 染色では出血や好酸体の産生、核小体の凝集、炎症細胞の浸潤といった急性肝傷害に特徴的な所見が LPS/GalN 投与群で著明にみとめられたが、プロスタサイクリン製剤投与群ではそれらの出現が抑制されていた。好中球浸潤の指標となる Myeloperoxidase (MPO) 染色では LPS/GalN 投与群に比べプロスタサイクリン製剤投与群で有意に好中球浸潤が抑制された。またアポトーシス細胞を染色する TUNEL 染色においては LPS/GalN 投与群に比べプロスタサイクリン製剤投与群で TUNEL 陽性細胞の増加が有意に抑えられた。アポトーシスの早期に関連する最も重要なプロテアーゼのひとつである Caspase-3 は、切断され Cleaved caspase-3 となって活性化しアポトーシスを引き起こすが、イムノブロット法においては Cleaved caspase-3 の活性化が有意に抑制されていた。Reactive Oxygen species (ROS) はミトコンドリアで産生され、さまざまな物質に対し非特異的な化学反応をもたらし細胞を傷害しえる物質であるが、Dihydroethidium (DHE) 染色により ROS の産生を評価したところ、プロスタサイクリン製剤投与群では ROS の産生が抑制されていた。これらの所見はプ

プロスタサイクリンレセプターに特異的なアンタゴニストである CAY10441 の前投与により抑制された。細胞の分化・増殖あるいは細胞死を調節する転写因子についてイムノブロット法で検討したところ、LPS/GalN により p-ERK1/2 の減少、p-JNK の上昇をみとめたが、それらの変化に対しプロスタサイクリン製剤は効果を示さなかった。p-p38 および p-CREB は LPS/GalN 投与群、プロスタサイクリン製剤投与群ともに Control 群に対し明らかな変化を認めなかった。一方、p-STAT3 については GalN/LPS 投与により発現量が上昇し、プロスタサイクリン製剤投与により発現量が抑制された。間接的に肝保護作用を示す因子として、*hgf*, *c-met*, *nrf2*, *hb-egf* について mRNA の発現量を定量的 PCR 法で解析したが、明らかな変化を認めなかった。

次にプロスタサイクリン製剤がどのように急性肝傷害に対し保護的に作用しているか *in vitro* の実験を行った。本研究では肝組織を構成するもののうち、肝実質細胞としてヒト肝癌由来細胞株である HepG2 を、クッパー細胞としてマウス肝臓由来マクロファージの不活化細胞株である KUP5 を、また human liver sinusoidal endothelial cells (LSECs, ヒト肝類洞壁内皮細胞) について検討を行った。結果、HepG2 では GalN 25mM で 24 時間刺激したところ *il-8*, *tnf- α* の遺伝子発現量が上昇し、MTT アッセイで約 80% の細胞死亡率をみとめたが、それらの変化はプロスタサイクリンによって抑制されなかった。一方、GalN 25mM で 1 時間刺激した際の ROS 産生の上昇はプロスタサイクリンによって抑制される傾向をみとめた。KUP5 については LPS 刺激によって上昇した *il-6*, *tnf- α* , *mip-2* の遺伝子発現量がプロスタサイクリンによって抑制されなかった。LSECs については IL-6 および TNF- α で刺激したが ROS の産生に変化はみられなかった。

〔総括〕

急性肝傷害に対する有効な薬物の発見、開発が求められている中、本研究においては LPS/GalN 投与によって誘導された急性肝傷害に対し、炎症性サイトカインおよびケモカインの発現、血清 AST, ALT の上昇、肝実質のアポトーシス誘導、好中球の浸潤をプロスタサイクリン製剤が有意に抑制し、肝保護的な効果を示すことを見出した。その分子機構の一部としてプロスタサイクリンが肝実質での ROS の産生を抑えるという可能性が考えられた。敗血症に伴う急性肝傷害に対しプロスタサイクリン製剤は有効な治療薬となり得ると考える。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

「目的」

急性肝傷害により急激に肝細胞が破壊され、生命維持が困難となる病態が急性肝不全である。敗血症に伴う臓器障害のひとつとしても急性肝傷害が起こり、肝炎ウイルスが完全に根絶できる今日でも、時に急性肝傷害に遭遇する。プロスタサイクリンは主に血管内皮細胞で産生され、血管拡張作用、血小板合成阻害作用があるが、近年、敗血症時の炎症性サイトカインの産生を抑制する効果や肝細胞増殖因子の発現を増加する効果が報告されている。

本研究は、ヒト急性肝傷害に類似したモデルとして使用されている Lipopolysaccharide (LPS) /D-galactosamine (GalN) 誘導性急性肝傷害マウスモデルにおける炎症性サイトカイン産生を抑制する効果が期待されているプロスタサイクリン製剤 (ONO-1301 およびベラプロスト) の治療効果とその分子機構を明らかにし、敗血症に伴う急性肝傷害の新たな治療薬の可能性を明らかにすることを目的とした。

「方法と成績」

1. C57BL/6J 雌性マウス 8 週齢に対し LPS : 10 μ g/kg + D-GalN 650 mg/kg を腹腔内投与し急性肝傷害を誘導した。急性肝傷害誘導 1 時間前に ONO-1301 (10mg/kg) もしくはベラプロスト (0.2mg/kg) を腹腔内注射した。6 時間後に血液、肝臓組織を採取、検討した。プロスタサイクリン製剤投与群では血清 AST, 血清 ALT の上昇が抑制された。肝臓組織での IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 mRNA を定量的 PCR 法により検討した。

プロスタサイクリン製剤投与群では IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 mRNA が低下していた。

2. 肝組織は出血、好酸体の産生、核小体の凝集、炎症細胞浸潤が製剤投与群で抑制されていた。TUNEL 染色では製剤投与群で TUNEL 陽性細胞の増加が有意に抑えられた。アポトーシスに関連する Caspase-3 は Cleaved caspase-3 活性化が有意に抑制されていた。Dihydroethidium (DHE) 染色による Reactive Oxygen species (ROS) 産生の評価ではプロスタサイクリン製剤投与群で ROS 産生は有意に抑制された。

3. 血清 AST, 血清 ALT の上昇、アポトーシス、ROS 産生はプロスタサイクリンレセプター特異的アンタゴニスト (CAY10441) 前投与により抑制された。ムノブロット法で細胞転写因子発現を検討すると、LPS/GalN により p-ERK1/2 減少, p-JNK 上昇を認めるが、それらの変化にプロスタサイクリン製剤は効果を示さなかった。p-STAT3 上昇はプロスタサイクリン製剤投与により発現量が抑制された。

4. ヒト肝癌由来細胞株 HepG2, マウス肝臓由来マクロファージ不死化細胞株 KUP5, ヒト肝類洞壁内皮細胞 LSECs を用いた *in vitro* 実験では、HepG2 では MTT アッセイにより約 80% の細胞死が認められたが、プロスタサイクリン製剤の抑制効果は認められなかった。ROS 産生

上昇は抑制される傾向を認めた。KUP5 の LPS 刺激では IL-6, TNF- α , MCP-1 mRNA 上昇はプロスタサイクリン製剤投与による抑制効果はなかった。LSECs では IL-6 および TNF- α 刺激による ROS 産生のプロスタサイクリン製剤投与による変化は認められなかった。

「論文の総括」

本研究により、三澤君は LPS/GalN 投与によって誘導される急性肝傷害マウスモデルではプロスタサイクリン製剤前投与により、炎症性サイトカイン、ケモカイン発現、血清 AST, ALT 上昇、肝細胞アポトーシス誘導、好中球浸潤を有意に抑制する効果があることを見出した。その分子機構の一部としてプロスタサイクリン製剤が肝実質の ROS 産生を抑制する可能性が示唆された。

本結果は、敗血症に伴う急性肝傷害に対しプロスタサイクリン製剤が、今後、有効な治療薬となり得る可能性を明らかにした点で学術的重要性があると考えられる。しかしながら、その分子メカニズムは必ずしも明瞭でなく、また、その機序解析と、臨床応用に向けた治療薬としての評価等の課題が残り、今後の検討が必要である。以上より本審査委員会は本研究を学術的および臨床的観点から価値の高いものであると評価し、博士（医学）の学位に値するものと判定した。